



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 198 41 125 A 1**

21 Aktenzeichen: 198 41 125.1
22 Anmeldetag: 9. 9. 1998
43 Offenlegungstag: 16. 3. 2000

51 Int. Cl. 7:
C 12 N 11/00
C 12 N 5/02
C 12 N 13/00
C 12 M 1/12
C 12 M 1/34

DE 198 41 125 A 1

71 Anmelder:
Institut für Oberflächenmodifizierung e.V., 04318
Leipzig, DE

72 Erfinder:
Zimmer, Klaus, Dipl.-Ing. Dr., 04683 Klinga, DE;
Otte, Karsten, Dipl.-Phys., 04209 Leipzig, DE;
Zeitschel, Ulrike, Dr.med., 04179 Leipzig, DE;
Hirsch, Dietmar, Dipl.-Chem., 04159 Leipzig, DE;
Braun, Alexander, Dipl.-Phys., 04177 Leipzig, DE;
Bigl, Volker, Prof. Dr.med., 04821 Polenz, DE; Bigl,
Frieder, Prof. Dipl.-Phys. Dr., 04249 Leipzig, DE

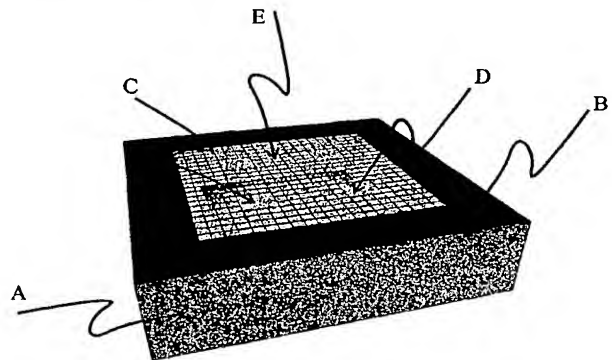
56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:
BIOSIS Abstract, Ref. 1993:272002;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

54 Verfahren und Anordnung zur Beweglichkeitseinschränkung von lebenden Zellen

57 Die Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zu schaffen, daß menschliche, tierische oder pflanzliche Zellen in ihrer Bewegung einschränkt ohne die Zelle dabei zu beschädigen. Die Erfindung betrifft außerdem die Erzeugung einer 3D-Mikrostruktur (Abb. I) und dem Einbringen der Zellen in diese. Mit der Erfindung soll erreicht werden, daß lebende Zellen nicht nur in ihrer Bewegung eingeschränkt, sondern auch ihre Zellmembran immobilisiert werden kann. Damit ist es möglich, AFM-Untersuchungen der Zellmembran mit einer hohen Auflösung durchzuführen. Herkömmliche Verfahren zur Immobilisierung von lebenden Zellen führen entweder nur zu einer unzureichenden Stabilisierung der Zellmembran oder zur Schädigung der Zelle selbst.

Die Aufgabe der Immobilisierung der Zelle wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß eine 3D-Struktur erzeugt wird, die in ihren Abmessungen der ausgewachsenen Zelle entspricht. Durch eine größere Öffnung in einer Seite der Mikrostruktur (Abb. I D) wird die Zelle entweder durch Zentrifugation oder durch Schütteln eingebracht. Durch das Anwachsen der Zelle innerhalb der Struktur erfolgt die schadigungsfreie Immobilisierung. Die Stabilisierung der Zellmembran wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß ein Teil der Mikrostruktur aus einer Membran mit Öffnungen besteht (Abb. I E), dessen Abmessungen wesentlich kleiner als die Zelle sind und die die anwachsende Zelle als solche immobilisiert. Die Erfindung soll des weiteren eine kostengünstige Alternative zu ...



DE 198 41 125 A 1

Beschreibung

Anwendungsgebiet

Die Erfindung betrifft die Erzeugung dreidimensionaler Strukturen bestimmter Dimension in Halbleitermaterial, Glas, Kunststoff, Keramik oder Verbindungen von diesen und deren Einsatz zur Beweglichkeitseinschränkung, Positionierung und Beeinflussung der Wachstumsrichtung von lebenden, unfixierten Zellen. Des weiteren beschreibt es ein Verfahren zur Einbindung der Zellen in die erzeugten Strukturen. Die Dimensionierung der erzeugten Struktur ermöglicht eine Immobilisierung der Zelle und der Zellmembran. Die Kombination aus Erzeugung von dreidimensionalen Strukturen, dem Einbringen von lebenden Zellen in diese und der damit erfolgenden Beweglichkeitseinschränkung kann insbesondere Anwendung in der hochauflösenden Mikroskopie (AFM-Atom-Kraft-Mikroskop) finden. Die bei Anwendung des Verfahrens gleichzeitig erfolgende genaue Positionierung der Zellen in den Strukturen kann zur gezielten Manipulation der Zellen genutzt werden und ermöglicht z. B. die Untersuchung von Zellen unter einer räumlich eingeschränkten Umgebung bzw. die Untersuchung des Wachstumsverhaltens von verschiedenen Zellen unter spezifischen wohldefinierten Bedingungen.

In einer weiteren Ausbaustufe können derartige Strukturen in Verbindung mit definiert an- bzw. eingebrachten Elektroden, Sensoren oder Akzeptoren als Schnittstelle von lebenden Zellen zu signalverarbeitenden Systemen Anwendung finden.

Stand der Technik

Die zum Stand der Technik gehörenden Verfahren beschreiben i.A. die Beobachtung von lebenden oder fixierten Zellen in einem verhältnismäßig großen Volumen und/oder deren Wechselwirkung mit Lösungen, elektrischen Potentialen oder der Substratoberfläche. Die dabei erzeugten Strukturen dienen der Befestigung von Zellen innerhalb des großen Volumens der Struktur. Neuere Untersuchungen beschreiben vor allem die Untersuchung der Zelloberfläche mit dem AFM. Die Vorteile der Anwendung der AFM-Technik in biologischen Fragestellungen bestehen in der Möglichkeit, native, unfixierte Zellen in Echtzeit zu beobachten, und somit Oberflächenveränderungen der Zelle, d. h. die Analyse dynamischer Eigenschaften, direkt zu untersuchen. Theoretisch sollte es möglich sein, mit der AFM-Technik bei diesen Analysen eine Auflösung im Bereich weniger Nanometer zu erreichen. Im folgenden sollen die wichtigsten dem Stand der Technik entsprechenden Methoden zur Untersuchung von lebenden und fixierten Zellen mittels AFM, der Versuch der Stabilisierung der Zellmembran und die dabei erzeugten Strukturen beschrieben werden.

(1) Untersuchungen an teilweise fixierten Zellen: Zum Stand der Technik gehören Untersuchungen an getrockneten Zellen, wie z. B. Neuronenkulturen (Cricenti, A., Destasio, G., Generosi, R., Perfetti, P., Ciotti, M. T. and Mercanti, D. Atomic Force Microscopy of Neuron Networks, Scanning Microscopy, 9 (1995) 695-700.; Cricenti, A., Destasio, G., Generosi, R., Scarselli, M. A., Perfetti, P., Ciotti, M. T., Mercanti, D., Casalbore, P. and Margaritondo, G. Native and Modified Uneoated Neurons Observed by Atomic Force Microscopy, J. Vac. Sci. Technol. A. 14 (1996) 1741-1746.), welche sich gegenüber lebenden Präparaten durch eine beträchtlich stabilere Zellmembran auszeichnen oder Untersuchungen an lebenden Makrophagen nach Phagozytose von Latexbeads zur "Auspolsterung" (Stabilisierung) der Zellen mit steifem Material (Beckmann, M., Kolb, H. A. and Lang,

F. Atonzic Force Microscopy of Peritoneal Macrophages After Particle Phagocytosis, J. Membrane. Biol. 140 (1994) 197-204.). Hoh, J. H. and Schoenenberger, C. A. (Surface Morphology and Mechanical Properties of MDCK Monolayers by Atomic Force Microscopy, J. Cell Sci. 107 (1994) 1105-1114.) untersuchten Veränderungen mechanischer Eigenschaften durch partielle Fixierung lebender Zellen. Dazu wurde der Einfluß von Glutaraldehyd auf die Messung der Oberfläche und die Kraft-Abstands-Kurve bestimmt (Beckmann, M. et al.). Auch die sogenannte Kryo-AFM-Technik versucht, das Problem der weichen Oberfläche lebender Zellen zu umgehen, indem die Messungen der Zellen unter flüssigem N₂ unter einem bestimmten Druck durchgeführt werden und zu einer stabileren Zellmembran führten (Han, W.H., Mou, J. X., Sheng, J., Yang, J. and Shao, Z.F. Cryo Atomic Force Microscopy A New Approach for Biological Imaging at High Resolution, Biochemistry-USA. 34 (1995) 8215-8220.; Shao, Z.F., Yang, J. and Somlyo, A.P. Biological Atomic Force Microscopy From Microns to Nanometers and Beyond, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 11 (1995) 241-265.; Shao, Z.F. and Zhang, Y.Y. Biological cryo atomic force microscopy: A brief review, Ultramicroscopy, 66 (1996) 141-152.; Zhang, Y.Y., Shao, Z.F., Somlyo, A.P. and Somlyo, A.V. Cryo-atomic force microscopy of smooth muscle myosin, Biophys. J. 72 (1997) 1308-1318). Benoit, M., Holstein, T. und Gaub, H. E. (Lateral forces in AFM imaging and immobilization of cells and organelles, Ellr. Biophys. J. Biophys. Lett. 26 (1997) 283-290.) versuchten, durch Immobilisation größerer Zellbestandteile an porösem Filtermaterial eine bessere Stabilisierung bei der Messung zu erhalten.

(2) Untersuchungen an lebenden Zellen: Zum Stand der Technik gehören Beobachtungen mechanischer und elastischer Eigenschaften von lebenden Zellen wie z. B. des Zytoskeletts (Hofmann, U.G., Rotsch, C., Parak, W.J. and Radmacher, M. Investigating the cytoskeleton of chicken cardiocytes with the atomic force microscope, J. Struct. Biol. 119 (1997) 84-91.; Radmacher, M., Rotsch, C., Fritz, M., Kacher, C.M., Hofmann, U., Gaub, H.E. and Hansma, P.K. Measuring the Elastic Properties of Bio Polymers and Living Cells with the Atomic Force Microscope, Abstr. Pap. Amer. Chem. Soc. 212 (1996) 324-POLY.) von Kardiocyten und Thrombozyten oder die Beobachtung dynamischer Eigenschaften von Aktinfilamenten in lebenden Gliazellen mittels AFM (Henderson, E., Haydon, P.G. and Sakaguchi, D.S. Actin Filament Dynamics in Living Glial Cells Imaged by Atomic Force Microscopy, Science, 257 (1992) 1944-1946). Auch bei Echtzeituntersuchungen der Aktivierung humaner Thrombozyten unter physiologischen Bedingungen konnten Komponenten des Zytoskeletts und membrangebundene Filamente nachgewiesen werden (Fritz, M., Radmacher, M. and Gaub, H.E. Granula Motion and Membrane Spreeding During Activation of Human Platelets Imaged by Atomic Force Microscopy, Biophys. J. 66 (1994) 1328-1334.; Fritz, M., Radmacher, M., Cleveland, J.P., Allersma, M.W., Stewart, R.J., Gieselmann, R., Jannmey, P., Schmidt, C.F. and Hansma, P.K. Imaging Globular und Filamentous Proteins in Physiological Buffer Solutions with Tapping Mode Atomic Force Microscopy, Langmuir. 11 (1995) 3529-3535.). Desweiteren konnte die dreidimensionale Struktur lebender Zellen und subzellulärer Strukturen dargestellt und Bewegungen von Filamenten unter der Zellmembran beobachtet werden; weiterhin gelang auch die mechanische Entfernung einzelner Zellen aus gemischten primären Zellkulturen mit Hilfe des AFM (Papura, V., Haydon, P.G. and Henderson, E. 3 Dimensional Imaging of Living Neurons and Glia with the Atomic Force Microscope, J. Cell Sci. 104 (1993a) 427-432). Zum Stand der Technik

gehört auch die Identifikation der zu untersuchenden Makromoleküle auf den Zellen u. a. mittels immunhistochemischer Darstellung mit Gold-markierten Antikörpern, so wurden z. B. Goldmarkierte sekundäre Antikörper zur Darstellung von Membranvesikel verwendet (Thimonier, J., Montixi, C., Chauvin, J. P., He, H.T., Rocca-Serra, J. and Barbet, J. Thy-1 immunolabeled thymocyte microdomains studies with the atomic force microscope and the electron microscope, *Biophys. J.* 73 (1997) 1627–1632).

(3) Auflösungsverbesserung der AFM-Messungen an lebenden Zellen: Eine Möglichkeit, die Auflösung der AFM-Untersuchung zu erhöhen, ist die Einschränkung der Beweglichkeit der lebenden Zellen. Zum Stand der Technik gehören allerdings nur sehr wenige Strukturen und Methoden, die direkt dazu eingesetzt werden, lebende Zellen in ihrer Bewegung zu immobilisieren und die Zelloberfläche zu stabilisieren. Nach einer Infektion mit einem Virus konnten Ohnesorge et al. (Ohnesorge, F.M., Hörber, J.K.H., Häberle, W., Czerny, C.P., Smith, D.P.E. and Binnig, G. AFM review study on pox viruses and living cells, *Biophys. J.* 73 (1997) 2183–2194) spezifische Prozesse an der Oberfläche lebender Zellen, welche mit einer Mikropipette fixiert waren, in Echtzeit (9 min) beobachten. Weiterhin wurden Porenfilter verwendet (S. Kasas and A. Ikai, A method for anchoring round shaped cells for atomic force microscope imaging, *Biophys. J.* 68 (1995) 1678), in welche die Zellen von der Rückseite eingebracht werden. Die resultierende Beweglichkeitseinschränkung ermöglicht bessere AFM-Untersuchungen. Eine andere Möglichkeit, die Auflösung zu verbessern, ist das Aufpressen der Zelle auf ein Substrat durch Zentrifugieren (H. Iwamoto, N. Wakayama, *Jpn. J. Appl. Phys.* 36 (1997) 3872).

Zum Stand der Technik gehören auch Methoden und Strukturen zur Immobilisierung von Zellen, Enzymen oder anderen Biomolekülen für viele analytische und biotechnologische Verfahren. Dabei werden die verschiedensten Techniken der adsorptiven Ankopplung an die Oberfläche oder Einkapselungsverfahren verwendet. Dazu gehören z. B. Glasfibernatten (Patent EP 0 267 470 A1), mit hydrophilen Polymeren beschichtete Träger (Patent EP 0 628 819 A2), Mikrokapseln für Filteranwendungen (Patent US 95/02 752) und poröse anorganische Materialien (Patent EP 0 314 290 A2, EP 0 121 981 B1). Die Änderung der Adhäsionseigenschaften des Substratmaterials kann z. B. auch durch das Anlegen von hochfrequenten elektrischen Impulsen an auf das Substrat aufgebrachte planare Elektrodenstreifen erfolgen. Durch inhomogene elektrische Felder entstehen wandernde oder wechselnde elektrische Oberflächenwellen. Diese werden zur lagestabilen Positionierung von Einzellern verwendet (DE 44 00 955 A1, EP 0 785 428 A1). Mit Hilfe des AFM ist auch die Messung der relativen Adhäsion verschiedener lebender Gliazellen an ein bestimmtes Substrat untersucht worden (Parpura, V., Haydon, P. G., Sakaguchi, D. S. and Henderson, E. Atomic Force Microscopy and Manipulation of Living Glial Cells, *J. Vac. Sci. Technol. A* 11 (1993) 773–775).

Zum Stand der Technik gehören des weiteren Lebenserhaltungssysteme, die dazu genutzt werden, die Wechselwirkung zwischen einer Zelle und einer die Zelle beeinflussen Substanz zu untersuchen (Patent: US 5 496 697 A).

Nachteile des Standes der Technik

Die im ersten Teil zum Stand der Technik gehörenden Verfahren ermöglichen zwar die Untersuchung der Zellen mittels AFM, jedoch ist die Auflösung aufgrund der weichen Zellmembran gering. Diese verhindert eine hohe Auflösung bei der Untersuchung der Zelle, da höhere Kräfte

eine Ablösung der Zelle von der Unterlage oder eine Schädigung der Zelle nach sich ziehen (V. Parpura et al.). Die teilweise Immobilisierung der Zelle (z. B. elektrische Felder, Fixierung etc.) führt zwar zur Verbesserung der Auflösung der Methode, aber auch zu einem Einfluß auf das natürliche Wachstum der Zelle oder sogar zum Absterben (Trocknung (A. Cricenti et al.), Kryo-AFM-Technik (Z.F. Shao et al.)). Eine Fixierung mit Mikropipetten (F.M. Ohnesorge et al.) bzw. Mikromanipulatoren z. B. bedeutet meist ein Herausreißen der Zelle aus ihrem natürlichen Zellverband und damit eine starke Beeinträchtigung, welche bei biochemischen Untersuchungen das Ergebnis verfälscht. Desweiteren erlaubt die Untersuchung an fixierten Zellen keine Darstellung dynamischer Eigenschaften, einem der Hauptvorteile des Einsatzes der Rasterkraftmikroskopie. Auch eine Manipulation von Zellen mittels neurobiologisch relevanter Substanzen ist nur an lebenden, ungestörten Zellen möglich.

Einige der beim Stand der Technik beschriebenen Verfahren zur Positionierung von Zellen erfordern umfangreiche und somit teure Strukturierungsschritte (z. B. Positionierung mittels elektrischer Felder). Desweiteren können die so positionierten und damit elektrophysiologisch beeinflussten Zellen nur sehr eingeschränkt elektrophysiologisch untersucht werden, da dies bereits zur Positionierung verwendet wurde.

Ein Nachteil der beschriebenen Methoden zur Immobilisierung von Zellen für analytische und biotechnologische Verfahren ist vor allem die Verwendung von vielen Zellen in einem großen Volumen. Entscheidend hierbei ist die Untersuchung ihrer Gesamtwirkung auf eine Lösung und nicht notwendigerweise die wirkliche Reaktion in der Nähe oder direkt an der Zellwand. Die adsorptiv arbeitenden Verfahren stabilisieren geringfügig die komplette Zelle, haben aber den Nachteil der mangelnden Stabilität der Zellmembran und der daraus resultierenden schlechten Verwendbarkeit für hochauflösende AFM-Untersuchungen. Bei den Einkapselungsverfahren werden die Zellen nicht an der Oberfläche, sondern innerhalb eines Körpers immobilisiert und sind somit nicht für das AFM zugänglich. Eine Positionierung der Zellen oder eine zusätzliche Strukturierung der Halterung ist außerdem zum großen Teil nicht möglich.

Aufgabe der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zu schaffen und eine Struktur zu erzeugen, die es ermöglicht, lebende Zellen in ihrer Bewegung einzuschränken. Von entscheidender Bedeutung dabei ist die Einschränkung der Bewegung und Stabilisierung, nicht nur der kompletten Zelle, sondern auch der Zelloberfläche, ohne diese dabei zu töten. Dies setzt voraus, daß die Einschränkung der Beweglichkeit der Zelle wie auch alle weiteren Untersuchungen in einer für sie nicht-toxischen Umgebung geschehen. Die Bewegungseinschränkung und Positionierung der Zelle soll eine mikroskopische Beobachtung mit dem AFM mit hoher Auflösung, eine Beobachtung des Zellwachstums und/oder eine gezielte Manipulation der Zelle ermöglichen. Es ist damit möglich, lebende Zellen über einen längeren Zeitraum zu beobachten und, kombiniert mit einem Lebenserhaltungssystem, Veränderungen während des Wachstums und der Differenzierung der Zelle oder den Einfluß neurobiologisch relevanter Substanzen auf die Zelle in Echtzeit zu verfolgen. Es ist weiterhin Aufgabe der Erfindung, das Volumen zur Zellbeobachtung und/oder Manipulation zu verkleinern. Die Auswahl der Materialien soll der Aufgabe entsprechend so erfolgen, daß durch weitere Prozeßschritte eine Manipulation und/oder die Beobachtung des Zellwachstums und/oder der -reaktion erfolgen kann. Des weiteren besteht die Aufgabe der

Erfindung darin, ein Verfahren und eine Struktur zu schaffen, welche eine preiswerte Alternative zu denen im Stand der Technik erwähnten darstellt.

Lösung der Aufgabe

Die Einschränkung der Beweglichkeit der lebenden Zelle wird erfindungsgemäß dadurch erreicht, daß eine dreidimensionale Struktur (Abb. I) erzeugt wird, die in ihren äußeren Abmessungen mindestens in 2 Dimensionen denen der lebenden, ausgewachsenen Zelle entspricht. Mindestens eine Öffnung an einer Seite oder ein Teil der Struktur muß der Größe der sich in Nährlösung befindlichen Zelle entsprechen, damit das Einbringen der Zelle in die Struktur ermöglicht wird (Abb. IC und Abb. IIC). Mit dem Anwachsen der Zelle und dem beginnenden Wachstum erfolgt aufgrund der Volumenzunahme der Zelle die Einschränkung ihrer Beweglichkeit. Durch eine Variation der Dimensionierung der erfindungsgemäßen dreidimensionalen Struktur ist eine Beweglichkeitsbeschränkung verschiedener Zelltypen möglich.

Die Beweglichkeitsbeschränkung der Zellmembran erfolgt erfindungsgemäß dadurch, daß ein Teil der Struktur aus einer Membran mit Öffnungen (Abb. IE und Abb. IIA) besteht, welche Löcher enthält, die kleiner als die Zelle sind und mehr als eines dieser Löcher über der Zelle liegt und die Zellwand als solche immobilisieren. Dies wird z. B. dadurch erreicht, daß sich die Zelle während ihres Wachstums in der Mikrostruktur an dessen Form (z. B. an die eines Mikronetzes) anpaßt und dadurch die Zellmembran in ihrer Eigenbewegung eingeschränkt und während der AFM-Messung stabilisiert wird. Die Dimensionierung der Maschenweite, die Dicke der Membran und der Breite der Stege hat entsprechend der Größe der ausgewachsenen Zelle und der zu erzielenden Stabilisierung zu erfolgen. Bei Verwendung z. B. von Gehirnzellen von Ratten beträgt die Maschenweite etwa $5 \times 5 \mu\text{m}^2$, die Dicke der Stege etwa 200–300 nm und die Breite der Stege etwa 300–400 nm. Die unter der Membran befindliche Wanne (Abb. ID und Abb. IIA) sollte nicht tiefer als 10 μm sein.

Das schädigungsfreie Einbringen bzw. die Positionierung der Zellen in die unter der porösen Membran befindlichen Wannen (Abb. ID) erfolgt erfindungsgemäß je nach verwendeter Struktur durch Zentrifugation oder Bewegung der Struktur in Nährlösung. Bei Verwendung von Mikrowannen mit einer Membranabdeckung (Abb. I) wird die Struktur in der Nährlösung bewegt, so daß sich die Zelle durch eine größere Öffnung (Abb. IB) der Membran bewegt und sich in dem darunter befindlichen Behälter absetzt. Eine Zentrifugation der Struktur in Nährlösung ist notwendig bei Strukturen, deren Öffnung sich seitlich der 3D-Mikrostruktur befindet. Des weiteren lassen sich auch Mikrostrukturen herstellen, deren Zellöffnung sich auf der Rückseite befindet (Abb. IIC). In allen Fällen wird gewährleistet, daß sich die Zelle in einer physiologischen Umgebung befindet.

Des weiteren erfolgt die Strukturherzeugung bei Verwendung von verschiedenen Substratmaterialien wie z. B. Si (Abb. IA) und SiO_2 (Abb. IB), Quarz, Quarz/SiN oder eine Kombination aus allen, um die Aufgabe der Erfindung nach verschiedenen Gesichtspunkten (Beobachtung in Transmission, Manipulation . . .) zu erfüllen.

Vorteile der Erfindung

Die erfindungsgemäß beschriebene Struktur ermöglicht nicht nur eine Immobilisierung der Zelle als Ganzes, sondern auch eine Stabilisierung der weichen Zellmembran. Dadurch ist es möglich, eine höhere Auflösung bei AFM-

Untersuchungen zu erreichen, ohne die Zelle in ihrem Wachstum zu schädigen. Die Zellen befinden sich unter physiologischen Bedingungen und zeigen ein normales Wachstum. Das Einbringen und damit die Positionierung der Zellen geschieht auf schonende Art und Weise, die Zellen werden nicht zusätzlich stimuliert, wie es z. B. bei einer mechanischen Positionierung mittels Mikromanipulatoren oder der Positionierung im Hilfe eines elektrischen Feldes zu erwarten ist. Dies hat den entscheidenden Vorteil, daß bei den verschiedenen Untersuchungen nur die Reaktion auf die experimentell gewünschten Stimuli gemessen werden können und nicht auf Reaktionen, welche zum Positionieren bzw. mechanischen Fixieren der Zelle dienen. Das erfindungsgemäß beschriebene Verfahren und die Struktur erlauben weiterhin die Beobachtung und/oder Manipulation von Zellen während ihres Wachstums, ohne die Zelle dabei unbeabsichtigt zu schädigen oder sogar zu töten. Ein wesentlicher Vorteil der beschriebenen Struktur ist die preiswerte Produktion von angepaßten Mikrostrukturen, die in Kombination mit dem Einbringen der Zelle je nach gewünschter Anwendungsart eine vielfältige Untersuchung der Zelle ermöglichen. Die damit verbundene Positionierung der Zelle ergibt eine preiswerte Alternative zu denen im Stand der Technik beschriebenen Verfahren der Bewegung der Zellen auf einem Substrat. Die Strukturen sind einfach handhabbar und leicht zu sterilisieren. Außerdem wird eine immunhistochemische Charakterisierung verschiedenster Oberflächenantigene nicht beeinflusst. Die freie Wahl der Dimensionierung der Mikrostruktur hat den Vorteil der Flexibilität bei der Wahl der zu untersuchenden Zellen, d. h. vor allem ihrer Größe. Desweiteren können mehrere solcher Strukturen beliebig oder in bestimmten Abständen sowohl in Reihe als auch in Serie durch Kanäle miteinander verbunden werden (Abb. II). Nach Befüllung benachbarter Strukturen kann beispielsweise auch der Einfluß der einzelnen Zellen untereinander bzw. durch räumliche Einschränkung das Wachstum der Zellen untersucht werden.

Für die Erzeugung der Mikrostrukturen können aus der Mikrosystemtechnik weitestgehend bekannte Verfahren herangezogen werden mit dem Vorteil einer preiswerten Massenfertigung. Ein weiterer großer Vorteil ist, daß die Zellen mittels eines Lebenserhaltungssystems im Langzeitversuch beobachtet werden können, da sie ohne Beeinträchtigung in einer der Zelle angepaßten Umgebung weiter wachsen können.

Ein weiterer Vorteil ist die Nutzung von verschiedenen Substratmaterialien, die vor allem die Vielfältigkeit des Verfahrens in den Vordergrund stellt. So ermöglicht die Verwendung von z. B. Si/ SiO_2 das nachfolgende Aufbringen eines elektrischen Kontaktarrays oder die Verwendung von z. B. Glas die gleichzeitige Beobachtung der Zelle in Transmission.

Beschreibung der Abbildungen

Abb. I Schematische Darstellung einer dreidimensionalen Wannenstruktur mit einer teilgeöffneten Deckschicht.

Abb. II Schematische Draufsicht auf eine beliebige Kombination von Einzellenhaltern mit Einfüllöffnungen von hinten und abgedeckten Verbindungskanälen.

Abb. III Prinzipielle Prozeßschritte bei der Herstellung von Mikrofixierelementen auf Siliziumbasis.

Abb. III-A Abscheidung eines geeigneten Schichtsystems auf einkristallinem Silizium.

Abb. III-B Erzeugung einer Haftmaske mittels lithographischer Methoden.

Abb. III-C Anisotrope Übertragung der Maskenstrukturen in die Oxidschicht mittels RIE oder strahlgestützter Ätz-

methoden.

Abb. III-D Anisotroper Ätzschritt des Siliziums zur Herstellung der Gruben.

Abb. IV Grundsätzliche Prozeßschritte bei der Herstellung von Mikrofixierelementen auf transparenten Trägern.

Abb. IV-A Abscheidung eines geeigneten Schichtsystems.

Abb. IV-B Erzeugung einer Haftmaske mittels lithographischer Methoden.

Abb. IV-C Anisotrope Übertragung der Strukturen durch die obere Fixierungsschicht in die Spacerschicht mittels RIE oder strahlgestützter Ätzmethoden.

Abb. IV-D Isotroper, vorzugsweise chemischer Ätzschritt zur Unterätzung der oberen Fixierungsschicht.

Beispielbeschreibung

Im folgenden sollen zwei Beispiele der Mikrostrukturierung und das Einbringen der Zellen in diese beschrieben werden. Die hier beschriebenen Strukturen wurden vorzugsweise, jedoch nicht notwendigerweise, mit einer Kombination aus Elektronenstrahl-Lithographie, Photolithographie oder Laser-Ablation und nachfolgenden Ätzschritten erzeugt. Des weiteren sind die Dimensionen der erzeugten Strukturen auf die Größe von den Gehirnzellen einer Ratte angepaßt. Eine Anpassung der Strukturdimensionen auf andere Zell-Arten ist allerdings ebenso Inhalt des Patentes.

Beispiel 1

Herstellung von mit einer teilgeöffneten Schicht abgedeckten Mikrofixierungsgruben in SiO_2/Si

Das erste Anwendungsbeispiel zielt auf die Herstellung von Fixierelementen in einkristallinem Silizium durch die Anwendung von Strukturierungsmethoden und trocken bzw. naßchemischer Ätzmethoden.

Mit dieser Methodik können Gruben bzw. trichterförmige Vertiefungen in einkristallines Silizium geätzt werden, die durch eine dünne, strukturierte Schicht abgedeckt werden. Vorzugsweise kommen dabei anisotrope Ätzmittel (NaOH) mit einer hohen Selektivität zur Deckschicht, beispielsweise Siliziumdioxid, zur Anwendung. Alternativ können auch isotrope Ätzer ($\text{HNO}_3 + \text{HF} + \text{H}_2\text{O}$) mit ausreichender Selektivität eingesetzt werden.

Typischerweise wird eine anorganische Deckschicht in Form eines Nitrides bzw. Oxides mit einer Dicke im Bereich von 200 nm bis 1 μm verwendet. Die Dicke der Deckschicht hängt vom verwendeten naßchemischen Ätzprozeß ab. Die resultierende Dicke der Deckschicht nach erfolgter Ätzung der Zellfixierungsgrube sollte nicht größer als 300 nm sein, um im Fall einer mikroskopischen Charakterisierung eine störungsfreie AFM-Messung zu ermöglichen. Die Herstellung der Mikrowannen erfolgt im einfachsten Fall nach folgendem Prozeßschema: Ausgangspunkt ist eine oxidierte Siliziumscheibe vorzugsweise mit einer $\langle 100 \rangle$ -Orientierung. Die Oxidschicht, die sowohl als Grubenabdeckschicht als auch als Siliziumätzmaske dient, kann durch thermische Oxidation, CVD-Verfahren oder mittels Sol-Gel-Technik hergestellt werden. Bei oxidierten Siliziumscheiben ist eine Dicke von etwa 500 nm in der Regel ausreichend.

Die als Grubenabdeckung vorgesehene und mit Öffnungen durchbrochene Deckschicht (**Abb. III-A B1b**) wird mit einer lithographischen Haftmaske (**Abb. III-B C**) versehen, die mittels Laserablation, Elektronenstrahl- oder Photolithographie hergestellt wird. Die Öffnungen setzen sich aus Befüllungs- und Analyseöffnungen zusammen, wobei die Befüllungsöffnung eine Größe von etwa 7–10 μm besitzt und

die Analyseöffnungen mit etwa 3 μm deutlich kleiner sind. Die Stegbreite zwischen den einzelnen Öffnungen sollte kleiner als 500 nm sein. Bei Nutzung der Elektronenstrahl-Lithographie ist eine 600 nm dicke PMMA (950 K) Schicht (Empfindlichkeit etwa 200 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ bei einem Strahlstrom von 1 nA) als Resistmaske günstig.

Nachfolgend wird die Struktur der Haftmaske vorzugsweise mittels Trockenätzen (RIBE mit CF_3H bei 700 V, 200 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, 15 Minuten) in die Oxidschicht übertragen, wodurch das Silizium (**Abb. III-D A1**) an den geöffneten Stellen freigelegt wird.

Nachfolgend wird ein naßchemischer Ätzschritt (wässrige Lösung von KOH 20% bei 80°C) durchgeführt, der zur Unterätzung der durchlöchernten Deckschicht führt. Bei Verwendung eines anisotropen Ätzers entsteht unter der durchbrochenen Deckschicht eine pyramidale Grube. Die Stegbreite sowie die Ätzzeit müssen so gewählt werden, daß die unter den Einzelöffnungen entstehenden Pyramiden sich zu einer Pyramide bzw. einem Pyramidenstumpf vereinigen. Die Tiefe der Gruben ist so der Dicke des Zellkörpers angepaßt, daß eine ober- und unterseitige mechanische Fixierung erfolgt. Die lateralen Abmessungen der Ätzgrube, die der Größe der Zelle entsprechen, werden durch die Öffnungen der Deckschicht vorgegeben und liegen üblicherweise im Bereich von 10 bis 100 μm .

Die Beimpfung von Mikrostrukturen mit Befüllungsöffnungen erfolgt durch definiertes oder zufälliges Einbringen von einer oder mehreren Zelle(n) mittels Mikropipette o. ä. bzw. Manipulatoren oder durch Ablagerung von "abgekap-selten" Zellen infolge der Wirkung von Gravitations- und/oder Zentrifugalkräften durch die Befüllungsöffnungen auf den Boden der Gruben. In der nachfolgenden Wachstumsphase erfolgt die mechanische Fixierung durch die allseitige Einengung des Zellkörpers.

Beispiel 2

Herstellung von mit einer teilgeöffneten Schicht abgedeckten Mikrofixierungsgruben in transparentes Material

Die ortsgenaue Untersuchung von mechanisch definiert fixierten Zellen mit dem Ziel der Nutzung hochauflösender Mikroskopieverfahren (AFM, SNOM-Scanning Nearfield Optical Microscopy) oder anderen optischen Methoden erfordert einen optisch transparenten Träger, der zumindest die mechanischen Fixierelemente aufnimmt. Darüber hinaus sind bei optisch transparenten Trägern eine Anzahl weiterer Untersuchungs-, Reiz- und Reizabnahmemethoden gleichzeitig mit den bereits genannten möglich.

Die Herstellung der Zellhaltevorrichtung erfolgt prinzipiell wiederum mittels anisotroper und selektiver Ätzverfahren. Im nachfolgend beschriebenen Fall wird dies durch die Kombination von $\text{SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4$ -Schichten, die auf einem Quarzträger aufgebracht werden, erreicht. Diese Materialien weisen bei Verwendung eines fluorhaltigen naßchemischen Ätzers (z. B. HF) eine deutlich unterschiedliche Ätzrate auf.

Auf einen doppelseitig polierten Quarzträger (**Abb. IV-A A1**) wird vorder- und rückseitig eine in der Dicke an die nachfolgenden Prozeßschritte angepaßte Siliziumnitridschicht (z. B. 250 nm) (**Abb. IV-A B1a** und **B1b**) aufgebracht, die als Ätzstoppschicht wirkt. Nachfolgend wird auf der Vorderseite eine in der Dicke der Zelldimension angepaßte Siliziumdioxidschicht (ca. 2 bis 5 μm ; **Abb. IV-C C1**) abgeschieden, die später zur Herstellung der Mikrozellfixierungsgruben dienen soll. Abschließend erfolgt eine nochmalige Beschichtung mit Si_3N_4 als Maskierungs- und Haltschicht (**Abb. IV-A B1c**).

Im folgenden lithographischen Schritt werden die Befüll-

und Meßöffnungen (Abb. II-E1 und 2) als Haftmaske definiert. Bei Verwendung der Elektronenstrahlolithographie (ESL) hat sich eine 1300 nm dicke PMMA-Resistmaske (Empfindlichkeit etwa $250 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ bei einem Strahlstrom von 2 nA) als günstig erwiesen (Abb. IV-B D1). Bei der ESL wird außerdem noch eine zusätzliche 50 nm dicke Titanschicht zwischen der Siliziumnitridschicht und dem PMMA aufgebracht. Die Haftmaske wird dann mittels RIBE (CHF_3 , 700 eV, $200 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, 100 Minuten) oder anderen anisotropen Ätzverfahren (z. B. RIE, IBE) in die obere Siliziumnitridschicht (Abb. IV-C B1c) und in die Siliziumdioxidschicht übertragen. Die Siliziumdioxidschicht muß dabei nicht vollständig durchätzt werden, sondern es kann eine Restdicke von ca. 1 μm Oxid verbleiben. Abschließend erfolgt die naßchemische Unterätzung (Abb. IV-D F) der oberen Siliziumnitridschicht mit einem fluorhaltigen Ätzmittel (BHF-Ätzer) durch selektive Auflösung des SiO_2 durch die geöffnete Siliziumnitriddeckschicht.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Beweglichkeitseinschränkung, Positionierung und Beeinflussung der Wachstumsrichtung menschlicher, tierischer oder pflanzlicher lebender Zellen unter Verwendung von dreidimensionalen Mikrostrukturen und dem Einbringen von Zellen in diese, **dadurch gekennzeichnet**,
 - (a) daß die Dimensionierung der in der Mikrostruktur enthaltenen Öffnungen an mindestens einer Stelle der Größe der sich in Nährlösung befindlichen Zelle entspricht;
 - (b) daß die Mehrzahl der Öffnungen in der Struktur so dimensioniert sind, daß sie kleiner sind als die durchschnittliche Größe der verwendeten Zellen;
 - (c) daß sich die Zelle in einer physiologischen Umgebung befindet.
2. Mikrostruktur nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sich an mindestens einer Seite der Struktur eine Membran befindet mit Öffnungen, die kleiner sind als die Zelle in Nährlösung.
3. Mikrostruktur nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß ein Teil der Struktur aus einem Halbleitermaterial besteht.
4. Mikrostruktur nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß ein Teil der Struktur aus einer Keramik, einem Oxid oder einem Polymer besteht.
5. Mikrostruktur nach Anspruch 3 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß sich auf oder in der Struktur Flächen aus Metall befinden.
6. Mikrostruktur nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß sich auf einem Substrat eine oder mehrere dieser Strukturen befinden.
7. Mikrostruktur nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Strukturen teilweise oder komplett miteinander verbunden sind.
8. Mikrostruktur nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß sich bei oder in der Nähe der Zelle eine oder mehrere Elektroden befinden.
9. Mikrostruktur nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß ein Teil der Struktur oder die komplette Struktur aus einer oder mehrerer Elektroden aufgebaut ist.
10. Verfahren zum Einbringen der lebenden Zellen in die Mikrostruktur, dadurch gekennzeichnet, daß sich die komplette Struktur in der Nährlösung befindet.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß sich ein Teil der Struktur in Nährlösung

oder chemisch definierten Substanzen befindet.

12. Verfahren nach Anspruch 10 und 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen durch Bewegung des Substrates in der Nährlösung in die Struktur eingebracht werden.

13. Verfahren nach Anspruch 10 und 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen durch Zentrifugation des Substrates in Nährlösung in die Struktur eingebracht werden.

14. Verfahren nach Anspruch 10 und 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen mit Hilfe mechanischer Hilfsmittel in die Struktur eingebracht werden.

15. Verfahren nach Anspruch 10 und 11, dadurch gekennzeichnet, daß ein Teil der Struktur oder die komplette Struktur mit der Nährlösung durchspült wird und so die Zellen in die Struktur eingebracht werden.

16. Verfahren nach Anspruch 10 und 11, dadurch gekennzeichnet, daß sich die Zellen eine ausreichend lange Zeit auf der Struktur befinden, die eine Haftung der Zellen innerhalb der Mikrostruktur ermöglicht.

17. Mikrostruktur nach einem der vorigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Struktur in Chipform in ein Keramikgehäuse mit elektrischen Anschlüssen eingefügt ist, wie sie für elektronische Schaltkreise verwendbar ist.

18. Mikrostruktur nach einem der vorigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Struktur Bestandteil einer Mikromanipulationseinrichtung ist.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

Abbildung I:

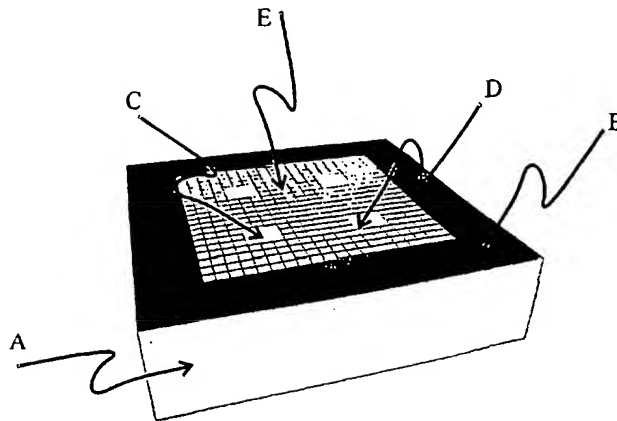
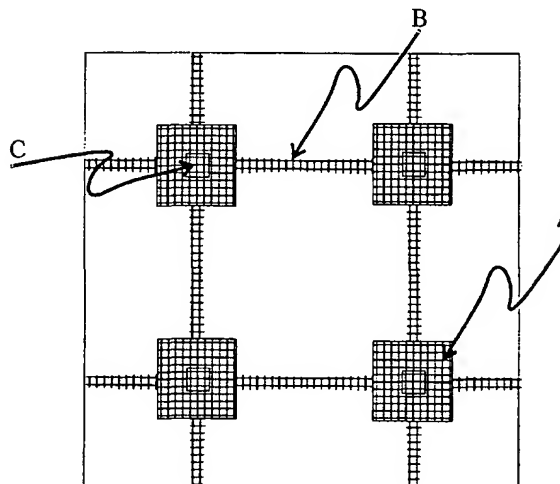


Abbildung II:



Abbildungen III: Prinzipielle Prozeßschritte bei der Herstellung von Mikrofixierelementen auf Siliziumbasis.

Abbildung III-A:

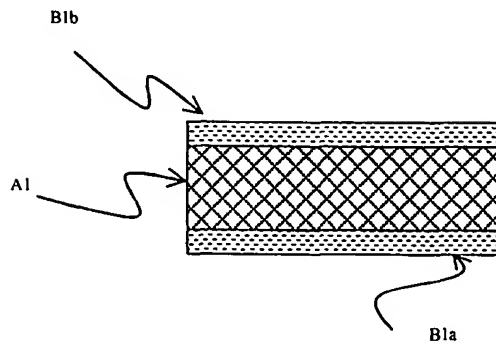


Abbildung III-B:

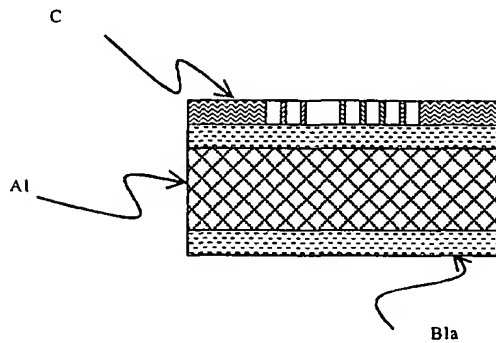


Abbildung III-C:

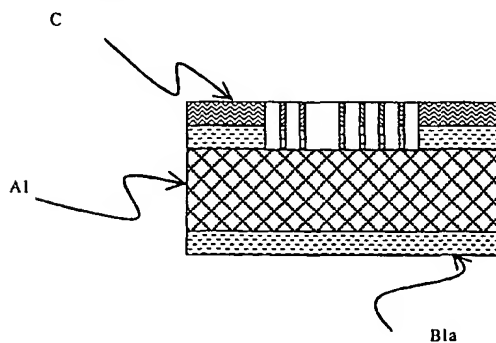
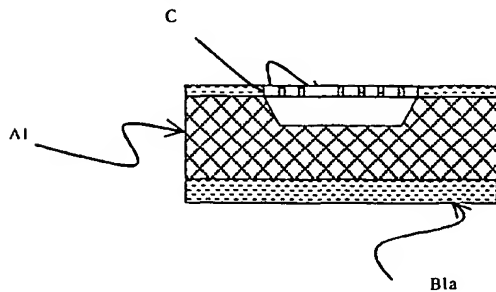


Abbildung III-D:



Abbildungen IV: Grundsätzliche Prozessschritte bei der Herstellung von Mikrofixierelementen auf transparenten Trägern

Abbildung IV-A:

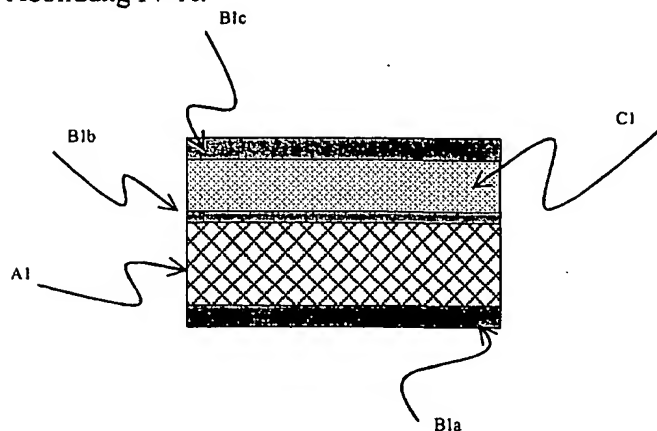


Abbildung IV-B:

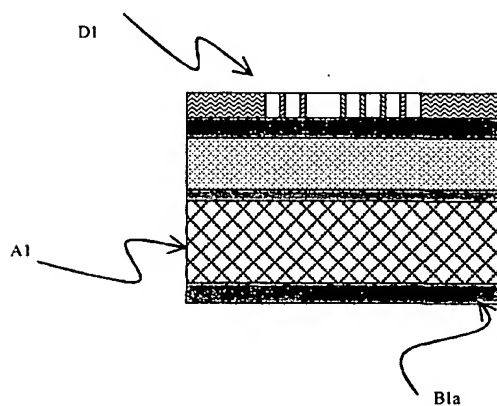


Abbildung IV-C:

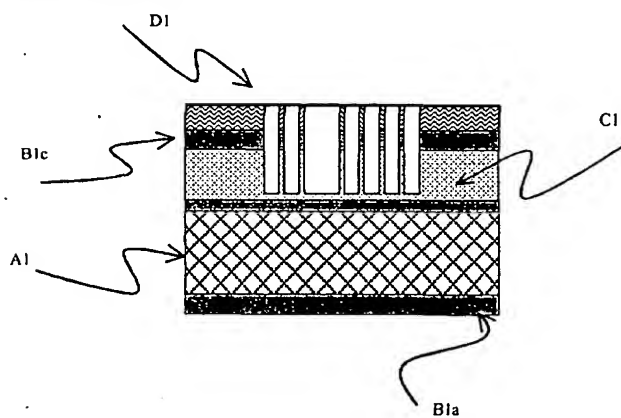


Abbildung IV-D:

